

鱼用基因工程疫苗研究与应用

FISH RECOMBINANT VACCINES: EXPERIMENTAL AND APPLIED ASPECTS

储卫华 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

中图分类号 S971.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)11-0024-03

免疫预防是通过刺激鱼类免疫系统,使其产生特异的免疫反应来增强鱼体的抗病能力,从而降低由疾病引起的损失。10年前,人们预测建立在基因工程技术基础之上的鱼用重组疫苗将会弥补传统疫苗的不足,能够有效的预防水生动物疾病的发生,基因工程疫苗能够预防从病毒、细菌到寄生虫所引起的疾病,与传统疫苗相比,基因工程疫苗更为安全可靠。鱼类基因工程疫苗的研究已有10多年,有必要对其作一全面的了解。

1 基因工程疫苗的特点

基因工程疫苗是用基因工程方法或分子克隆技术分离出病原的保护性抗原基因,将其转入原核或真核系统并表达出该病原的保护性抗原,制成疫苗;或者将病原的毒力相关基因删除或进行突变,使成为不带毒力相关基因的基因缺失苗或突变苗,基因工程疫苗只含有病原的部分组成,其最大优点是安全性好。与传统疫苗相比,基因工程疫苗还具有以下优点:第一,可降低生产成本,更廉价更大批地生产。第二,易于区分感染动物和免疫动物。由于基因工程苗只含有病原的1~2种蛋白成分,或者缺失某一蛋白成分,因此通过检测野毒中含有,而基因工程疫苗中没有的病毒蛋白的抗体可以方便地从免疫动物中区分出野毒感染者。第三,利用活载体可制成多价疫苗,达到一针防多病的目的。

根据基因工程疫苗研制的技术路线和疫苗组成的不同,目前鱼用基因工程疫苗可分为4大类^[1]:(1)基因工程亚单位苗;(2)基因缺失苗或突变苗;(3)活载体苗;(4)DNA疫苗。

2 基因工程亚单位苗

基因工程亚单位苗是指通过利用表达载体产生与病原体保护性抗原决定簇(抗原表位)的氨基酸序列相同的肽段。将表达载体转化到宿主体内(细菌、病毒、细胞等),保护性抗原片段在宿主生长过程中表达。这种肽段经制备成免疫原后接种机体,可以使机体产生保护性抗体。

确定病原体的抗原决定簇中使机体产生中和性抗体等保护性应答成分的氨基酸序列是设计亚单位苗的前提。在鱼类杆状病毒中的G蛋白是一种重要的中和性抗原,由500多个氨基酸组成,在杆状病毒的致病性中发挥着重要作用^[2]。传染性胰脏坏死病毒(IPNV)疫苗是目前唯一的一个商用重组蛋白疫苗,Christie等^[1]利用其中和性单克隆抗体测定的表位图显示:可变区VP₂区内部(aa200~350)折叠成了一种免疫显性结构,这种结构包括血清型特异的和中和性保守的表位,大肠杆菌表达的重组VP₂(rVP₂)可自发形成这种折叠结构。以部分纯化的大肠杆菌表达产物VP₂加完全佐剂免疫大西洋鲑,可明显提高其对IPNV的免疫力。针对IHNV病毒,Winton^[3]发现,将编码G蛋白的部分基因克隆到大肠杆菌或杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的减毒株中表达,通过浸浴法

第一作者:储卫华,出生于1972年,博士,讲师,主要从事水生动物微生物与免疫学研究。E-mail: chuweihua2002@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-07-02;修回日期:2003-02-25



免疫可产生保护作用。通过发酵来表达重组蛋白的抗原,常常产生很低的免疫保护,这可能是由于表达的重组蛋白的抗原性或免疫原性很低;其免疫途径也是影响重组蛋白疫苗效果的重要因素;另外,重组蛋白只含激发 B 细胞的表位,缺乏激发 T_H 细胞的表位,当一外来抗原进入机体后,要使机体的免疫系统开始启动,绝大部分的抗原需要同时具有 B 细胞和 T_H 细胞决定簇。所以,在考虑应用重组蛋白疫苗时,应尽量选择既含 B 细胞决定簇又含激发 T_H 细胞决定簇的肽段。尽管重组蛋白疫苗有一定的缺陷性,但仍具有广阔的前途。最近已经有将病毒抗原表位基因片段在植物体内表达且能诱导小鼠产生免疫保护的报道,这就为口服疫苗的研制提供了依据。

3 基因缺失活疫苗或突变苗

将病原菌或病毒的致病力相关的基因删除后构建的活疫苗称之为基因缺失疫苗。Marsden 等¹⁴将杀鲑单胞菌的 *aroA* 基因删除构建了减毒活疫苗;又如, Vanderheijden 等¹⁵将斑点叉尾鲴病毒 (channel catfish virus) 的 ORF50 基因中删除一段 1 200 bp 的序列,成功构建了减毒株 V60。储卫华等¹⁶用转座子将嗜水气单胞菌的蛋白酶缺失后,发现其毒力下降,但能够使鲫鱼产生一定的保护。这种在核酸水平上缺失毒力相关基因的方法,因具有遗传背景清楚、疫苗株不易返祖而重新获得毒力的优点成为发展活疫苗的理想途径。

减毒活疫苗接种后可在鱼体内繁殖,由于其接种过程与自然的感染过程相似,可刺激机体产生长期的中和抗体以及诱导良好的细胞介导应答,一次接种后即可产生较好的免疫,具有一定的应用价值。但是减毒活疫苗可能仍保留部分毒性,是否会对周围环境中的其他鱼类造成危害是我们在使用过程中应该慎重考虑的问题。

4 活载体疫苗

这类疫苗以某种非致病性病毒或细菌(株)为载体来携带并表达其他强致病性病原的与保护性免疫相关的抗原基因。这是用基因工程方法,将一种病原免疫相关基因整合到另一种载体基因组 DNA 的复制必需片段中构成的重组活载体疫苗。在被接种的机体中,特定免疫原基因可随重组载体的复制而适量表达。鱼用的活载体疫苗如针对病毒 IHNV, VHSV 和

IPNV, Noonan 等¹⁷将它们的抗原表位基因——G 蛋白基因转入杀鲑气单胞菌的无毒菌株 A440 中,通过活疫苗 A440 感染大西洋鲑,可使其产生针对这几种病毒的保护性免疫。

5 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称核酸疫苗和基因疫苗,它通过编码免疫原或与免疫原相关的 DNA(有时也可是 RNA)由宿主细胞表达抗原蛋白,达到免疫效果。与其他免疫方式相似,DNA 免疫可导致两种免疫类型,体液免疫和细胞介导免疫。前者由抗原激活 B 细胞产生特异抗体,后者则是诱导产生细胞毒素 T 淋巴细胞 (CTLs)。抗体可中和病原体,而 CTLs 可杀死病原细胞或通过非细胞溶解方式控制感染,因此 CTLs 更为重要,它能有效防范特定的病原体,在抗病毒和抗胞内菌感染中,它是真正有效的免疫效应细胞。DNA 疫苗是指含有编码抗原基因的真核表达质粒 DNA,经直接接种体内后,可被宿主细胞摄取,并转录、翻译、表达出相应的抗原,然后通过不同途径刺激机体产生针对此种抗原的免疫应答。DNA 疫苗最基本的成分是质粒 DNA。质粒绝大多数来源于细菌,是细胞质中的一类独立于染色体的能自主复制的遗传成分,由环型双链 DNA 组成。用于构建 DNA 疫苗的质粒通常由 5 个部分组成:(1) 细菌的复制起点,用于复制大量的质粒 DNA;(2) 抗性选择基因,如抗氨苄青霉素基因或抗卡那霉素基因,用作筛选的标记;(3) 编码抗原蛋白或多肽的基因,这些保护性抗原编码基因可以是一组基因,也可以是单基因的 cDNA,还可以利用关键性抗原表位的一段碱基序列。一般选择病原体表面糖蛋白编码基因(如乙肝病毒基因疫苗)构建 DNA 疫苗。被表达的蛋白质可在宿主体内糖基化,诱导对病原体的免疫反应;有些易变异的病毒,如 A 型感冒病毒,则可以选择不同亚型之间共有的核心蛋白保守 DNA 序列作为疫苗基因,产生跨株系的免疫保护反应,以避免易变异病毒可能产生的免疫逃避问题。(4) 转录调控因子,如启动子、内含子和增强子等用于提高基因的表达量。常用的质粒载体启动子多为来源于病毒基因组的启动子,具有增强转录作用。(5) 最后是一多聚腺嘌呤序列用作 mRNA 的转录终止信号。大多数质粒在大肠杆菌中复制后纯化而获得。最近有人报道,用携带 DNA 表达质粒的减毒细菌作为载体感染宿主后将质粒带入体内,也能产生免疫效果。



自 Wolff 等^[7]于 1990 年首次提出核酸疫苗的设想后,核酸疫苗的发展出人意外的迅速。早期 DNA 疫苗的研究主要是以哺乳动物为模型,近年来,越来越多的研究发现,鱼类的细胞同样能够有效地表达由真核表达载体所携带的外源蛋白基因,也就是说, DNA 疫苗同样适用于鱼类。Kanellos 等^[8]将含有巨细胞病毒启动子(CMV)及 LacZ 基因的质粒(PCMV-LacZ)通过肌肉接种到金鱼体内,14d 后,在金鱼的肌纤维及肾脏中检测到了大肠杆菌 β -半乳糖苷酶(β -gal)。他们同时还发现,质粒 DNA 所表达的抗原蛋白诱发了金鱼的细胞免疫及体液免疫,但是并不引起自身免疫,目的基因也没有整合入金鱼的染色体中。进一步实验证明,用质粒 DNA 进行肌肉接种免疫与用 β -gal 加佐剂进行腹腔免疫所产生的抗体滴度几乎相同。这些实验说明,外源基因完全可通过质粒 DNA 在鱼体内得到表达并且充当很好的免疫原。

目前,鱼用 DNA 疫苗主要针对的是病毒病,研究较多的是出血性败血病毒(VHSV)和传染性造血组织坏死病毒(IHNV)疫苗。已知这两种病毒的 G 蛋白均包含有中和性表位, Boudinot 等^[1]根据它们的 G 蛋白基因,分别构建了 pcDNAgVHS 质粒和 pcDNAgIHN 质粒(包含 CMV 启动子)。将这两种质粒分别通过肌肉注射到虹鳟体内,不久即发现鱼的肌肉组织中有质粒 DNA、G 蛋白的 mRNA 及 G 蛋白存在,这 3 种物质均能诱导机体产生具有中和活性的抗体。Lorenzen^[9]针对 VHSV 病毒 G 蛋白构建的 DNA 疫苗能够诱导 70% 的虹鳟产生较高水平的免疫保护性。

与常规基因重组疫苗相比, DNA 疫苗有以下优点:(1)易于构建、易于制备和稳定性高。(2)具有高效性。DNA 疫苗以 10~100 g/尾的剂量免疫即可得到良好的免疫效果。另外,由于质粒本身具有佐剂的功效,因此使用 DNA 疫苗免疫接种时不用加佐剂。但是, DNA 疫苗也存在缺陷,目前为止, DNA 疫苗的接种多采用肌肉注射,这种方法耗时费力,在实际生产中具

有一定的局限性。因此,探索新的免疫接种方法是 DNA 疫苗研究需要解决的问题。

鱼用基因工程疫苗的研究在近 10 年有了飞快的发展,但是其中多数的免疫效果与常规疫苗相比还没有表现出明显的优越性。因此重组 DNA 技术进行的基因工程疫苗的研究还有很长的路要走。

参考文献

- 1 Lorenzen N. Recombinant vaccine :experimental and applied aspects . Fish & Shellfish Immunology , 1999(9) :361 - 365
- 2 Coll M. The glycoprotein G of rhabdoviruses . Arch Virol , 1995 , 140(5) :827 - 851
- 3 Winton J R. Immunization with viral antigens . Developments in Biological Standardization , 1997 ,90 :211 - 220
- 4 Marsden MJ , Vaughan , L M , Foster T J , et al . A live(delta aero A) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T cell responses relative to B cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) . Infect Immun , 1996 ,64(9) :3 863 - 3 869
- 5 Vanderheijden N , Alard P , Lecomte C , et al . The attenuated V60 strain of channel fish virus possesses a deletion in ORF50 coding for a potentially secreted glycoprotein . Virology , 1996 ,218(2) :422 - 426
- 6 储卫华 ,陆承平 .筛选用转座子 *Tn916* 诱变的具有免疫原性的嗜水气单胞菌蛋白酶缺失株 .水产学报 ,2001 ,25(3) :244 - 248
- 7 Wolff J A , Milone R W , William P , et al . Direct gene transfer into muscle in vivo . Science , 1990 , 247 :1 465 - 1 468
- 8 Kanellos T , Sylvester I D , Howard C R , et al . DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish . Vaccine , 1999 ,17(7 - 8) :965 - 972
- 9 Lorenzen N , Lorenzen E , Einer J K , et al . Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus : a small amount of plasmid DNA protect against a heterologous serotype . Virus Research , 1999 , 63(1 - 2) :19 - 25

(本文编辑:刘珊珊)